

SUBSTRATE FOR HIGH DENSITY CELL ARRAY, PRODUCTION METHOD, AND METHOD FOR USING THE SAME

Publication number: JP2003033177

Publication date: 2003-02-04

Inventor: YAMATO MASAYUKI; OKANO MITSUO

Applicant: OKANO MITSUO

Classification:

- international: G01N33/50; A61K45/00; A61P35/00; C12M1/00; C12M1/34; C12N1/00; C12N11/08; C12N15/09; C12Q1/02; G01N33/15; G01N33/53; G01N33/566; G01N37/00; G01N33/50; A61K45/00; A61P35/00; C12M1/00; C12M1/34; C12N1/00; C12N11/00; C12N15/09; C12Q1/02; G01N33/15; G01N33/53; G01N33/566; G01N37/00; (IPC1-7): C12N11/08; A61K45/00; A61P35/00; C12M1/00; C12M1/34; C12N1/00; C12N15/09; C12Q1/02; G01N33/15; G01N33/50; G01N33/53; G01N33/566; G01N37/00

- european:

Application number: JP20010223593 20010724

Priority number(s): JP20010223593 20010724

Report a data error here

Abstract of JP2003033177

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a culture substrate, a cell array, a device for automatically injecting a chemical substance, and an assay system, which are used for assaying chemical substances such as various medicines and toxic substances. **SOLUTION:** This substrate for high density cell array has a surface in which cell-adhesive polymer-coated areas are discontinuously finely and regularly arranged, surrounded with areas coated with a cell-non-adhesive hydrophilic polymer, and further continuously surrounded with an area coated with a cell- non-adhesive strongly hydrophobic material. The substrate for the high-density cell array, and the assay system using the substrate are used for optimizing the kind of a medicine (for example, an anticancer medicine) and its using concentration. Thereby, the adverse effects of the medicine can highly be suppressed, and the treatment results of disease can largely be improved. The technique can be effectively utilized for the development of medicines, environmental assessments and basic life science researches.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2003-33177

(P2003-33177A)

(43)公開日 平成15年2月4日(2003.2.4)

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード*(参考)
C 1 2 N 11/08		C 1 2 N 11/08	C 2 G 0 4 5
A 6 1 K 45/00		A 6 1 K 45/00	4 B 0 2 4
A 6 1 P 35/00		A 6 1 P 35/00	4 B 0 2 9
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A 4 B 0 3 3
1/34		1/34	B 4 B 0 6 3
審査請求 未請求 請求項の数17 O L (全 10 頁) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2001-223593(P2001-223593)

(22)出願日 平成13年7月24日(2001.7.24)

(71)出願人 593064630

岡野 光夫

千葉県市川市国府台6-12-12

(72)発明者 大和 雅之

東京都世田谷区用賀2-28-16

(72)発明者 岡野 光夫

千葉県市川市国府台6-12-12

(74)代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 高密度細胞アレイ用基板、製造法、及びその利用方法

(57)【要約】

【課題】 多種の薬物・毒物等の化学物質を簡便にアッセイするために必要な培養基板、細胞アレイ、化学物質の自動注入装置、アッセイ系を提供すること。

【解決手段】 細胞付着性高分子に被覆された領域が不連続に微細に規則正しく並べられ、そのまわりを細胞非付着性の親水性高分子に被覆された領域が囲み、さらにそのまわりを細胞非付着性の強疎水性材料に被覆された領域が連続的に囲んでいる表面を持つことを特徴とする高密度細胞アレイ用基板を用いる。この高密度細胞アレイ基板、及びそれを利用したアッセイ系により、使用する薬剤(例えば、抗ガン剤)の種類、使用濃度の最適化をおこなうことで、薬剤の副作用を大きく減少させると共に、疾患の薬物治療成績を大きく向上させることが可能である。また、本技術は、医薬品開発や環境アセスメント、基礎生命科学研究にも利用でき、極めて有効な技術である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 細胞付着性高分子に被覆された領域が不連続に微細に規則正しく並べられ、そのまわりを細胞非付着性の親水性高分子に被覆された領域が囲み、さらにそのまわりを細胞非付着性の強疎水性材料に被覆された領域が連続的に囲んでいる表面を持つことを特徴とする高密度細胞アレイ用基板。

【請求項2】 細胞付着性高分子に被覆された領域が500～1000、000個/cm²の割合で配列されたものであることを特徴とする請求項1記載の高密度細胞アレイ用基板。

【請求項3】 細胞付着性高分子が刺激応答性高分子であることを特徴とする請求項1、2記載の高密度細胞アレイ用基板。

【請求項4】 刺激応答性高分子が光に応答するものであることを特徴とする請求項3記載の高密度細胞アレイ用基板。

【請求項5】 細胞非付着性の親水性高分子に被覆された領域が、細胞付着性高分子に被覆された領域を一ヶ所ずつ囲んでいることを特徴とする高密度細胞アレイ用基板。

【請求項6】 支持体上に少なくとも細胞付着性高分子層、細胞非付着性の親水性高分子層、さらに細胞非付着性の強疎水性材料層が積層されたものに対し、それぞれの層の一部が基板表面の一部として現れるようにレーザーアブレーションすることを特徴とする請求項1～5記載の高密度細胞アレイ用基板の製造方法。

【請求項7】 積層されたものが支持体側から刺激応答性高分子層、親水性高分子層、強疎水性高分子層の順に積層されたものであることを特徴とする請求項6記載の高密度細胞アレイ用基板の製造方法。

【請求項8】 細胞付着性高分子に被覆された領域毎に細胞を付着させ、細胞非付着性の親水性高分子に被覆された領域毎に微量の培地を付着させて利用することを特徴する請求項1～5記載の高密度細胞アレイ用基板の利用方法。

【請求項9】 微小領域で培養している細胞毎に、インクジェットプリンタヘッドを利用した任意に希釈もできる化学物質自動注入装置を用いて、さまざまな濃度の化学物質、或いはさまざまな種類の化学物質を投入し、その後、細胞毎に生死の判定、或いは活性測定することを特徴とする請求項8記載の高密度細胞アレイ用基板の利用方法。

【請求項10】 微小領域で培養している細胞毎に、特定の遺伝子を導入し、その後、細胞毎に活性測定することを特徴とする請求項8記載の高密度細胞アレイ用基板の利用方法。

【請求項11】 細胞評価、或いは遺伝子操作後、特定の活性を持つ細胞のみを、それが付着している細胞付着性高分子領域に刺激を与えることで剥離、回収すること

を特徴とする請求項8～10記載の高密度細胞アレイ用基板の利用方法。

【請求項12】 細胞付着性高分子に被覆された領域に与える刺激が光であることを特徴とする請求項11記載の高密度細胞アレイ用基板の利用方法。

【請求項13】 請求項1～5記載の高密度細胞アレイを用いることを特徴とする化学物質のスクリーニング方法。

【請求項14】 化学物質が医薬品である請求項13記載のスクリーニング方法。

【請求項15】 医薬品が抗ガン剤である請求項14記載のスクリーニング方法。

【請求項16】 化学物質が毒物、環境有害物質である請求項13記載のスクリーニング方法。

【請求項17】 請求項1～5記載の高密度細胞アレイ用基板を用いることを特徴とする遺伝子導入方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、新規な培養基板、該培養基板を用いる高密度細胞アレイ用基板およびそれらの製造法に関する。また、本発明は、高密度細胞アレイ用基板上で培地が分離された各細胞を化学物質等に対する評価、及び遺伝子導入操作等に利用する方法に関する。さらに、本発明は、その細胞評価、或いは遺伝子操作後、特定の活性を持つ細胞のみを剥離、回収する方法に関する。また、さらに、本発明は上記操作による医薬・毒物等の化学物質のスクリーニング方法、遺伝子導入方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ガンの薬物治療は血液細胞のガンなどでは非常に大きな成果をあげているが、ある種の固形ガンではいまだ十分な成果をあげるに至っていない。その理由の一つに、抗ガン剤の効果がガン細胞間で様でないにもかかわらず、実際に投与する前にその有効性、必要量を調べる有効手段がないことがあげられる。抗ガン剤の種類は多く、その処方も様ではないため、簡便に複数の抗ガン剤をアッセイできる培養細胞を利用したシステムが開発できれば、実際に患者に処方する前に、腫瘍から採取したガン細胞を培養し、多種の抗ガン剤についてその効果の有無や必要な処方量を決定でき、現状では副作用の問題を十分回避できていないガンの薬物治療を大きく進展させることが期待できる。しかし、生検で採取できる細胞の量は微量であり従来の培養法では多種類の処方を検定できず、また従来の培養法では、多検体とすればそれだけの培養容器が必要となり、臨床の場において行うことはその規模の点からもまた必要な労力の点からもまったく現実的でない。近年、実験動物の希少性や個体差に起因する低再現性、ヒトとの種差などの問題点が指摘され、ヒトなどの培養細胞を用いた薬物・毒物評価技術の開発が大きく注目されている。また、新薬

開発の低コスト化、医薬品の安全性の確認、環境アセスメントなどの観点から、多種の薬物・毒物を同時に短時間でアッセイする技術の開発の必要性も強く指摘されている。これらの要求に対して、半導体加工技術として知られていたマイクロファブリケーション（微細加工）技術を応用して、数cm～10cm程度の大きさをもつ基板上で電気泳動やクロマトグラフィをおこなうデバイス（“ラボ・オン・チップ”）の開発が注目を集めている。たとえば核酸の電気泳動においては、従来別々の装置で行われていたゲルの作成、電気泳動、バンドの検出、データ解析の全てを全自動化したシステムがすでに市販されている。“ラボ・オン・チップ”技術を用いることで

（１）少量のサンプルしか必要としない、（２）多検体を同時に大規模で並列的にアッセイできる、（３）システム化により手作業を自動化でき、高再現性が得られる、（４）廃液量が激減し環境に与える影響を極小にできる、（５）毒性のある試薬の使用量が激減し、安全性が高い、（６）分析コストの軽減化などが達成できるなどのメリットが得られる。

【0003】抗体や酵素がその高い特異性による微量測定、定量化を目的としている一方、生体が示す反応を理解するには、これまで実験動物に頼らねばならなかった。細胞はたとえ一個であってもコンピュータや化学コンビナートにも匹敵する複雑な情報処理能力と化学反応を示すため、単にその量を計測するのではなく、いわば対象となる薬物・毒物が生体に与える影響の質を計測するのに使えるのではないかとこの視点から大きな期待がもたれている。1細胞単位の計測をおこなうシステムとしては、フローサイトメーターがあり、膜表面抗原の定量的な計測が可能になるなど、免疫学の進歩に大きく貢献したが、すでに20年以上の歴史をもち、今後も大きな進歩はないと考えられる。フローサイトメーターは血球などの浮遊系の細胞を対象としており、培養皿上で培養した付着性の細胞の場合には培養皿から回収して懸濁する必要がある、例えば、付着性ガン細胞の超多検体同時評価などには用いることができない。近年、レーザー स्क্যানサイトメトリと呼ばれる、コンピュータ制御のX-Yステージと蛍光顕微鏡を組み合わせた機械が市販されている。これはスライドガラス上の組織標本中の細胞を一個ずつ計測することを目的としている。すなわち一枚のプレパレート上の細胞はすべて同じ条件下の細胞であり、薬物の評価にこれを用いる場合、薬物の種類、条件の数だけプレパレートが必要となるため、多数の異なる薬物を異なる条件下で同時に評価するために用いることは困難であった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明者らは、上記の問題点の重要性を痛感し、多検体を同時にアッセイするシステムの研究開発を重ねた。その結果、本発明者らは、水との親和性が異なる材料を用いて、1cm²に細胞

500～100,000個という高密度で、またそれぞれの細胞の培地を完全に分離して培養できる高密度細胞アレイ用培養基板を作製することに成功した。また、本発明者らは、様々な化学物質を種々の濃度で自動注入するインクジェットプリンタヘッドを改造した化学物質自動注入装置（ナノディスペンサ）を製造し、1枚の高密度細胞アレイ用培養基板を使うだけで、一度に多検体のアッセイを行うことのできるシステムを完成させた。さらに、アッセイ後、基板上の特定の細胞のみを剥離、回収させることもできるようになり、その細胞をさらに別の用途へ利用することもできる技術を完成させた。本発明はかかる知見に基づいて完成したものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、細胞付着性高分子に被覆された領域が高密度に並べられ、そのまわりを細胞非付着性の親水性高分子に被覆された領域、さらにそのまわりを細胞非付着性の強疎水性材料に被覆された領域が囲んだ新規な表面を有する高密度細胞アレイ用基板を提供する。また、本発明は、少なくとも3種類の材料が積層化された支持体に対し、それぞれの層の一部が基板表面の一部として現れるようにレーザーアブレーションするという高密度細胞アレイ用基板の製造方法を提供する。加えて、本発明は、高密度細胞アレイ用基板上で培地が分離された各細胞を化学物質等に対する評価、及び遺伝子導入操作等に利用する方法を提供する。さらに、本発明は、その細胞評価、或いは遺伝子操作後、特定の活性を持つ細胞のみを剥離、回収する方法を提供する。さらに、加えて、本発明は上記高密度細胞アレイを用いることを特徴とする医薬、毒物等の化学物質のスクリーニング方法、遺伝子導入方法を提供する。

【0006】

【発明の実施の形態】本願明細書において用いられている、本発明に係る用語について以下に説明する。

細胞アレイ：大規模並列アッセイを目的として、多数のDNA断片（オリゴヌクレオチド）を固定化したDNAアレイが注目を集めている。アレイは元来「整列している」という程度の意味であるが、一部のDNAアレイが半導体作製に用いる光リソグラフィを用いて作製されるためDNAチップなどとも呼ばれる。DNAアレイ技術の延長として多数の抗体を配列させたプロテインアレイが開発されている。細胞アレイでは、DNAアレイ、プロテインアレイに続く次世代技術として細胞を高密度に細胞を配列させる。本発明においては、並列多検体アッセイを目的として細胞付着性高分子に被覆された領域に1細胞ずつ付着させ、一枚の高密度細胞アレイ用基板上に細胞500個～100,000個を配列させる。

ナノディスペンサ：本発明の細胞アレイ上では、各細胞毎に完全に分離した培地中で細胞培養をおこなうため、同時に500種類～100,000種類の培養条件を検討できる。化学物質を指定された量だけ注入する装置を

ディスペンサと呼び、ここでは各々のドメイン内の培地中にナノ〜マイクロリットルの薬物溶液を注入するためナノディスペンサと呼ぶ。

ハイスループットスクリーニング：これまで新薬の開発や毒性評価において大量の培養皿や実験動物を用いざるをえず、活性のある薬物の探索に要するスクリーニングのコストは莫大なものであった。近年のコンビナトリアルケミストリ技術の発展にともない評価すべき物質の数は飛躍的に増加しており、低コストで高速な評価・探索の重要性がますます高まり、超並列化可能な新技術「ハイスループットスクリーニング」が強く求められている。

インクジェットプリンタヘッド：市販のカラーインクジェットプリンタの多くのヘッドは使い捨てであり、ヘッド単体の価格は1,000円程度である。この安価な、ヘッドで数ピコリットルの液滴が十分な精度で噴射できる。本システムでも薬剤毎にヘッドを使い捨てにすることにより、汚染の可能性やメンテナンスを最小限にすることができる。

共焦点レーザー走査顕微鏡：光源にレーザーを用い、検出器に光電子倍增管を用いることで、高精度に再現性良い蛍光の検出が可能である。レーザー光はガルバノミラーを用いて焦点面上の必要な範囲のみを走査するので、大面積の観察でも退色がないため、本発明のシステムには最適である。

ラボオンチップ：マイクロファブリケーション技術を用いて、反応層や流路などを一枚のチップ上にマイクロメートルサイズで作製し、一枚のチップで電気泳動やPCRをおこなう新技術。必要な薬剤の微量化、高速化などが可能となる。

電子線重合：電子線照射により発生させたラジカルを利用してラジカル重合をおこなう。大面積への共有結合的固定化が可能。すでに広く産業応用されており、低コストで運転できる。

レーザーアブレーション：照射したレーザーのエネルギーにより表面を構成する分子間の結合を切ることで、照射表面を微細加工する技術。

【0007】決められたサイズの細胞付着性領域を作製して1細胞を基板上に多数配列させる技術は、これまでに少数、萌芽的な研究が報告されている。基本的に光リソグラフィ技術を用い、基材としてはシリコンまたはガラスを用いている。しかし、これらの方法は大量生産には向いておらず、またいずれの報告もミリメートル程度の大きさに数十から百個程度の細胞が配列しているだけである。これに対し本発明では、シリコンやガラスではなく安価なプラスチック材料を用いて基板を作製し、大量生産に適した加工法を選択しており、大幅な低コスト化が期待できる。また、本発明で利用する電子線重合およびレーザーアブレーションは大面積化が容易であり、高密度でセンチメートルの大きさをもつ基板を容易に作

製できる。なお、Yamato M., Kwon O. H., Hirose M., Kikuchi A., Okano T., "Novel patterned cell co-culture utilizing thermally responsive grafted polymer surfaces", J. Biomedical Materials Research, 55, 137 (2001) には、本発明でも用いる電子線照射法によりパターン状に高分子を培養皿表面に固定化して、従来にない安価かつ簡便に複数種の細胞のパターン化共培養を達成したことが記載されている。また、Hirose H., Kwon O. H., Yamato M., Kikuchi A., Okano T., "Creation of designed cell sheets that are noninvasively harvested and moved to another surface", Biomacromolecules, 1, 377-381 (2000) には、同一表面に二種類の高分子を固定化して細胞接着性弱疎水性ドメインと細胞非接着性高親水性ドメインを作製することが記載されている。いずれも本願発明の要素技術を示すものである。

【0008】本発明において、「高密度」とは、培養基板1cm²あたり500〜100,000ヶ所の細胞付着性高分子が被覆された領域が各々分離した状態で配列することができる表面であることを意味する。好ましくは、培養基板が1cm²あたり1,000〜50,000ヶ所、特に好ましくは、10,000〜30,000ヶ所を各々分離した状態で配列することができる表面を有することが特に好ましい。本発明では、その細胞付着性領域それぞれに細胞を付着させるが、その付着させる細胞数には何ら制約はないが、細胞付着性領域の広さと細胞の大きさを考え、1ヶ所の細胞付着性領域に1〜20個の細胞を付着させるのが良く、好ましくは1〜5個、さらに好ましくは1〜2個の細胞を付着させるのが良い。本発明の細胞付着性高分子とは、例えば、イオン性基、親/疎水性基等を有するもの、また、それらを支持体表面に被覆後、グロー放電、コロナ放電などで表面処理を施したもの、さらには、フィブロネクチン、コラーゲン、ラミニン等の細胞接着性蛋白質のいずれかもしくは組み合わせた高分子或いはそれらの処理物で良く、特に限定されるものではない。

【0009】本発明では、細胞付着性高分子として、刺激応答性高分子を用いることで、化学物質による検定、或いは遺伝子導入後等に、特定の活性を有する細胞のみを選択的に剥離させられる。その刺激応答性高分子の一例である温度応答性高分子は、ホモポリマーであっても共重合体であってもよい。使用し得る温度応答性高分子の基本構成単位としては、例えば、アクリルアミド、メ

タクリルアミド等の(メタ)アクリルアミド化合物、N-エチルアクリルアミド(単独重合体の下限臨界溶解温度72℃)、N-n-プロピルアクリルアミド(同21℃)、N-n-プロピルメタクリルアミド(同27℃)、N-イソプロピルアクリルアミド(同32℃)、N-イソプロピルメタクリルアミド(同43℃)、N-シクロプロピルアクリルアミド(同45℃)、N-シクロプロピルメタクリルアミド(同60℃)、N-エトキシエチルアクリルアミド(同約35℃)、N-エトキシエチルメタクリルアミド(同約45℃)、N-テトラヒドロフルフリルアクリルアミド(同約28℃)、N-テトラヒドロフルフリルメタクリルアミド(同約35℃)等のN-アルキル置換(メタ)アクリルアミド誘導体、N,N-ジメチル(メタ)アクリルアミド、N,N-エチルメチルアクリルアミド(単独重合体の下限臨界溶解温度56℃)、N,N-ジエチルアクリルアミド(同32℃)等のN,N-ジアルキル置換(メタ)アクリルアミド誘導体、さらに1-(1-オキソ-2-プロペニル)-ピロリジン(同56℃)、1-(1-オキソ-2-プロペニル)-ピペリジン(同約6℃)、4-(1-オキソ-2-プロペニル)-モルホリン、1-(1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル)-ピロリジン、1-(1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル)-ピペリジン、4-(1-オキソ-2-メチル-2-プロペニル)-モルホリン等の環状基を有する(メタ)アクリルアミド誘導体、メチルビニルエーテル(単独重合体の下限臨界溶解温度35℃)等のビニルエーテル誘導体、また細胞の種類によって臨界溶解温度を調節する必要がある場合や、被覆物質と支持体との相互作用を高める必要が生じた場合や、細胞付着性表面の親水、疎水性のバランスを調整する等の目的で、上記以外のモノマー類との共重合、重合体同士のグラフト重合または共重合、あるいは重合体、共重合体の混合物を用いてもよい。また、重合体本来の性質を損なわない範囲で架橋することも可能である。また、刺激応答性高分子の一例である光応答性高分子としては、アゾベンゼン基を有する吸収性高分子のように光異性化反応を起こす高分子、トリフェニルメタンロイコハイドロオキシドのビニル誘導体とアクリルアミド系単量体との共重合体のように光イオン解離する感応基を有する温度応答性高分子、或いはスピロベンゾピランを含むN-イソプロピルアクリルアミドゲルのように疎水性相互作用が光変化する温度応答性高分子を用いることができる。被覆を施される支持体の材質は、通常細胞培養に用いられるガラス、改質ガラス、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート等の物質のみならず、一般に形態付与が可能である物質、例えば、上記以外の高分子化合物、セラミックス、金属類など全て用いることができる。その形状は、ペトリ皿等の細胞培養皿に限定されることはなく、プレートであってもよい。

【0010】支持体への細胞付着性高分子の被覆方法

は、支持体と被覆物質を、(1)化学的な反応によって結合させる方法、(2)物理的な相互作用を利用する方法、を単独または併用して行うことができる。すなわち、(1)化学的な反応によって結合させる場合は、電子線照射(electron beam; EB)、 γ 線照射、紫外線照射、プラズマ処理、コロナ処理等を用いることができる。さらに、支持体と被覆材料が適当な反応性官能基を有する場合は、ラジカル反応、アニオン反応、カチオン反応等の一般に用いられる有機反応を利用することができる。(2)物理的な相互作用による方法としては、被覆材料単独または支持体との相溶性のよいマトリックスを媒体とし(例えば、支持体を形成するモノマーまたは支持体と相溶性のよいモノマーと被覆材料とのグラフトポリマー、ブロックポリマー等)、塗布、混練等の物理的吸着を用いる方法等がある。細胞付着性高分子として刺激応答性高分子を選択しない場合、その被覆量に制約はないが、細胞付着性高分子として刺激応答性高分子を選択した場合、その被覆量は、0.1~5.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ の範囲が良く、好ましくは0.3~3.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、さらに好ましくは0.5~2.5 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ である。0.1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ より少ない被覆量のと看、刺激を与えても当該高分子上の細胞は剥離し難く、作業効率が著しく悪くなり好ましくない。逆に5.0 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上であると、その領域に細胞が付着し難く、細胞を十分に付着させることが困難となる。高分子の被覆量は、例えばフーリエ変換赤外分光計全反射法(FT-IR-ATR法)、被覆領域の染色や蛍光物質の染色による分析、さらに接触角測定等による表面分析を単独或いは併用して求めることができる。本発明の細胞付着領域の広さが分析可能な範囲より狭い場合は、あらかじめ分析可能な広さで被覆量を求めておく必要があり、その条件と同条件で被覆すれば良い。

【0011】本発明の高密度細胞アレイ基板は、上記細胞付着性高分子が被覆された領域の周りを細胞非付着性の親水性高分子が被覆された領域で囲んだものである。その細胞非付着性の親水性高分子が被覆された領域内にある細胞付着性高分子が被覆された領域の数は何ら制約されるものではないが、好ましくは1~50個、さらに好ましくは1~20個、特に好ましくは1~5個である。本発明の高密度細胞アレイ基板はこの細胞非付着性の親水性高分子毎に培地が分割されるので、細胞非付着性の親水性高分子が被覆された領域内にある細胞付着性高分子が被覆された領域の数が少ないほど、多くの細胞を異なる条件下で培養できるようになり、したがって検体数も多くなり好ましい。細胞非付着性の親水性高分子として、例えば、ポリアクリルアミド、ポリジメチルアクリルアミド、ポリエチレングリコール、セルロースなどが挙げられるが、細胞を付着させず、水と親和性の高いものならばいずれのものでも良い。細胞非付着性の親水性高分子の被覆量は、微量の培地の保持ができれば何

ら制約されないが、その被覆量は、 $0.1 \sim 20.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の範囲が良く、好ましくは $0.3 \sim 10.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、さらに好ましくは $0.5 \sim 5.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ である。 $0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ より少ない被覆量のとき、微量の培地の保持し難く、逆に $20.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上であると顕微鏡下で観察する際、この領域の凹凸の像が顕著となり好ましくない。ここに示す各分析値は、上記の方法に従えば求めることができる。また、支持体への細胞非付着性の親水性高分子の固定は、細胞付着性高分子を被覆したときの方法に従えば良い。

【0012】本発明では、この細胞非付着性の親水性高分子が被覆された領域の周りをさらに細胞非付着性の強疎水性材料に被覆された領域が連続的に囲んだものである。その材料は、細胞を付着させず、また水をはじくものであれば何ら制約されないが、例えば、シリコン高分子やその誘導体、フッ素含有高分子やその誘導体等が挙げられる。なお、本願明細書および図面において、「高分子」と「ポリマー」は同じ意味を有し、それぞれ置き換え可能である。細胞非付着性の親水性高分子の被覆量は、微量の培地の保持ができれば何ら制約されないが、その被覆量は、 $0.1 \sim 20.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ の範囲が良く、好ましくは $0.3 \sim 10.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、さらに好ましくは $0.5 \sim 5.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ である。 $0.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ より少ない被覆量のとき、微量の培地をはじき難く、逆に $20.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 以上であると顕微鏡下で観察する際、この領域の凹凸の像が顕著となり好ましくない。ここに示す各分析値は、上記の方法に従えば求めることができる。また、支持体への細胞非付着性の強疎水性高分子の固定は、細胞付着性高分子を被覆したときの方法に従えば良い。

【0013】本発明の高密度細胞アレイ基板の製造は、得られた高密度細胞アレイ基板表面に、少なくとも細胞を付着させられる領域、その外側に微量の培地を保持させられる領域、さらにその外側に微量の培地をはじける領域が形成されていれば何ら制約されるものではないが、例えば支持体側から細胞付着性高分子層、親水性高分子層、強疎水性材料層の順に積層されたものを用い、レーザーアブレーションにより各層の一部が基板の表面に現れるように削っていく方法が挙げられる。得られる構造体を図1に示す。その製造法は、図2に示す通りである。すなわち、ポリスチレンを基板として用い、プラズマ照射することにより細胞が接着できる細胞付着性領域となる。このポリスチレンの基板上に、親水性、強疎水性の2つの高分子を電子線照射法により順次、積層させた後、UVエキシマレーザーの強度を変えながら、一層および二層の厚さだけ削って、親水性領域、細胞付着性領域を露出させる。この方法により、1細胞の大きさ（約 $5 \sim 40$ マイクロメートル四方）に十分な広さの細胞付着性領域を露出させることができる。この作業を繰り返して、 500 個 $\sim 100,000$ 個/ cm^2 の密度

で細胞アレイを作製することができる(図3)。

【0014】こうして得られた高密度細胞アレイ基板に対し、以下に示す方法で、細胞を付着させ、さらに親水性高分子の被覆領域ごとに独立して培地を付着させる。まず、高密度細胞アレイ基板への細胞付着は、常法通り、基板全体を覆うに十分な量の培地中に所定の細胞を分散させ、静置させるだけで良い。分散された細胞は沈降し、細胞付着性領域にのみ付着する。次に、過剰な培地を静かに吸引し続けられ、培地を親水性高分子の被覆領域ごとに独立して残すことができる。その際、さらに吸引して、インクジェットプリンタヘッドを用いてあらためて個々の細胞に対し培地の微量液滴を付着させる方法でも良い。上記高密度細胞アレイの各々の細胞を含む培地に任意の濃度で化学物質（例えば、薬物、毒物等）を自動注入は、例えば、図4に示すようなインクジェットプリンタヘッドを改造した化学物質の自動希釈機能付き自動注入装置（ナノディスペンサー）を用いることでできる。本装置によれば、化学物質貯蔵タンク、希釈用培地貯蔵タンク、マイクロポンプ、マイクロバルブからなる自動希釈回路をプリンタヘッド流路に接続し、ポンプ、バルブおよびヘッドをコンピュータで制御し、薬物を任意の濃度で出力できる。出力する液量はすでに $2 \sim$ 数十ピコリットルオーダーの液滴の出力が実現しており問題ない。これをコンピュータ制御のX-Yステージに設置した細胞アレイの真上に設置し、細胞アレイの位置を移動させながら注入する。

【0015】上記高密度細胞アレイ基板および上記自動注入装置に既存の共焦点レーザー走査顕微鏡、コンピュータ制御X-Yステージ、および細胞の生死、細胞活性を検出するための蛍光分析装置を組み合わせることにより、アクセシ系を確立することができる。

【0016】以下に本発明の技術の具体的に述べる。細胞アレイ用支持体としては、安価でありまた透明であるため光学顕微鏡観察に適したプラズマ処理ポリスチレン利用することができる。この上に刺激応答性高分子、さらにその上に、1細胞毎の培地の保持するために必要な親水性領域を形成する親水性高分子、そして、1細胞毎に培地を隔離させるために必要な疎水性領域を形成する疎水性高分子を積層して共有結合的に固定化する。各層の固定は、まず、最下層のモノマーを展開した後に電子線照射することで行い、これをくり返すことで完了する。これをUVレーザーを用いて任意サイズ、形にアブレーションすることにより、細胞付着性高分子に被覆された領域が高密度（ 1 cm^2 に細胞 500 個 $\sim 100,000$ 個）で配列した基板を作製する。また、インクジェットプリンタヘッドを改造した自動希釈機能付きナノディスペンサーを用いることにより、各々の細胞を含む培地に任意の濃度で薬物の自動注入が可能となる。スルーputは細胞 500 個 $\sim 100,000$ 個あたり流路の洗浄なしで1分以内を実現する。洗浄は希釈系列の変

更すなわち薬物の変更毎におこなうが、一洗浄あたり10秒〜60秒で行なうことが可能である。細胞反応の検出については、既存の共焦点レーザー走査顕微鏡を用い、X-Yステージをコンピュータ制御のものに交換して用いる。なお、TOF-SIMSと接続することにより1細胞中に発現する全タンパク質を定量的に検出することも可能である。例えば、1枚の細胞アレイにガン細胞と正常細胞をそれぞれ1万個ずつ播種し、薬物を作用させた後、細胞の生死、細胞活性を検出する蛍光性物質を用いて、多種類の薬物の濃度依存的なガン細胞殺傷能、細胞毒性を1枚の細胞アレイで同時にアッセイできる。これによって、超多検体細胞アッセイ自動化システムが安価で構築できる。また、本システムは、臨床現場における抗ガン剤のスクリーニングのみならず、新薬開発や環境アセスメントなどにも用いることができる。さらに、本発明の技術によれば、アレイ状に高密度に配置した細胞に遺伝子導入を行い、遺伝子発現した細胞のみ選択的にアレイ基板上から回収したり、あるいは化学物質に対する細胞活性を測定し、特定の反応性を示す細胞のみを選択的にアレイ基板上から回収することができる。回収した細胞を増殖させ組織として利用したり、細胞医薬や医療用具として利用可能である。

【0017】本発明ではヒトに作用する薬物・毒物を対象としてヒトおよび動物細胞を培養するが、これらの細胞を用いて1細胞〜少数の細胞ずつ培地を分離して培養できる培養系に関する報告は存在しない。また、本発明においては超多検体アッセイの全自動化を目的として、自動希釈機能付きナノディスペンサーを提供するが、マイクロメートルの空間制御とナノリットルの液滴量を実現する、このような精度のナノディスペンサーについても報告はない。インクジェットプリンタヘッドを改造したマイクロディスペンサーに関する報告はいずれも数桁大きなサイズである。最新のヘッドとX-Yステージを組み合わせることにより本発明のナノディスペンサーを作製することが可能となった。本発明では、培地が完全に分離された1細胞1培養環境が500〜100,000個配列した高密度細胞アレイ基板と自動希釈機能付ナノディスペンサーを組み合わせることで、一枚のアプレタート上で500〜100,000種類の異なる培養条件を達成し、薬物・毒物の迅速な超多検体評価を行なうことが可能であり、これらの点は従来技術には全く見られない。また、本発明は、特に莫大な情報量の高速処理が求められる新薬開発や環境アセスメントにも対応できる超多検体同時計測を可能にする点でも世界に類を見ない独創的な技術である。本発明においては、臨床の現場で実際に医師が用いることを目的として、簡便でランニングコストが安価であることを1つの目的として最大限重視している。以上のように、本発明はきわめて独創的で、また従来の基礎研究的なレベルを大きく超えて産業応用可能性を大きくもつものである。

【0018】

【実施例】以下に、実施例に基づいて本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されない。

【実施例1〜5】細胞付着性高分子としてポリ-N-イソプロピルアクリルアミド、親水性高分子としてポリアクリルアミド、さらに強疎水性高分子としてポリジメチルシロキサンを使用した。それぞれの層を作成するための使用したモノマー、及びポリマー溶液濃度を表1に示す。これらの溶液を用い、以下の方法で各層を作成した。まず、細胞付着性高分子被覆領域を作成するため、表1に示す濃度のN-イソプロピルアクリルアミドモノマーのイソプロピルアルコール溶液を0.01ml/cm²の割合でポリスチレン製支持体上に塗布をした。このものへ0.25MGyの強度の電子線を照射し、支持体表面にポリ-N-イソプロピルアクリルアミドを被覆させた。照射後、基板を水で十分に洗浄し、乾燥させることでポリ-N-イソプロピルアクリルアミド層を有する基板を得た。基板上的ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド被覆量を表2に示す。次に、この上へ細胞非付着性の親水性高分子被覆領域を作成するため、表1に示す濃度のアクリルアミドモノマーのイソプロピルアルコール溶液を0.01ml/cm²の割合で基板上に塗布をした。このものへ上記方法と同様な強度の電子線を照射させ、その後、洗浄、乾燥を行うことでポリ-N-イソプロピルアクリルアミド層の上にポリアクリルアミド層を有する基板を得た。基板上的ポリアクリルアミド被覆量を表2に示す。さらに、この上へ細胞非付着性の強疎水性高分子被覆領域を作成するため、表1に示す濃度のポリジメチルシロキサンのエタノール溶液を0.01ml/cm²の割合で基板上に塗布をした。このものへ上記方法と同様な強度の電子線を照射させ、その後、洗浄、乾燥を行うことで上記基板上にポリジメチルシロキサン層を有する基板を得た。基板上的ポリジメチルシロキサン被覆量を表2に示す。得られた基板をコンピュータ制御のX-Yステージ上に置き、ArFエキシマレーザー（波長193nmのパルスレーザー、浜松ホトニクス製L5910）を用いて、各層が基材表面に現れるように削っていった。その際、ポリアクリルアミド層を露出させるために0.1J/cm²の強度のレーザーを用いた。さらにその中心部に約30μmの正方形のポリ-N-イソプロピルアクリルアミド層を露出させるために、さらに0.1J/cm²の強度のレーザーで表面を削った。これらの操作を繰り返し、10,000ヶ所/cm²のポリ-N-イソプロピルアクリルアミド層を露出させた。反射型レーザー共焦点顕微鏡により、削られた表面がきわめて平坦であり、エッジもシャープであること、アプレートした結果、各層の厚さは約30nmであることが明らかになった。また、基材表面の元素分析をESCAによって行ったところ、ポリアクリルアミド

層としたところにSi元素の存在は認められず、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド層としている領域のN元素濃度はポリ-N-イソプロピルアクリルアミドとそれと一致していることから、本実施例の操作により各層が基材の表面として露出できていることを確認することができた。次に、得られた基板上にシリコンゴムを介して壁を設け、その中へ5%ウシ胎児血清(FCS)、 10^{-8} Mデキサメサゾン、 10^{-7} Mインスリン、10mMニコチンアミド、さらに10ng/ml上皮細胞成長因子(FGF)を含むウィリアムズE培地を培地として 10^5 個/ml濃度で分散されたラット初代肝実質細胞を播種した。5%二酸化炭素雰囲気下、37℃で3時間静置させることで各ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド層に1個のラット初代肝実質細胞が付着した。その一例として、実施例1の高密度細胞アレイ基板上の肝実質細胞のようすを図5に示す。細胞は細胞付着性高分子領域を認識し、選択的に接着していた。次に、基板上の培地を静かに吸引し、インクジェットプリンタヘッドを改造したマイクロディスペンサーにより各親水性高分子被覆領域に10ピコリットル上記培地中の0~4.5mMのジクロルベンゼンを分散させたもの(0.5mM毎に10種類、1000個の各親水性高分子被覆領域毎に濃度を変えた。)を37℃下で付着させた。10分

後、2.5mM以上のジクロルベンゼンが分散された培地中の細胞が形態的に異なっていた。その後、本基板全体を上記培地で十分洗浄し、最終的に再び静かに培地を吸引し、各親水性高分子被覆領域のみに培地が残るようにした。そのまま20℃で15分間冷却し、基材表面から剥離しかけている細胞を、ジクロルベンゼン分散濃度別にシリンジを用いて剥離、回収することができた。

【0019】

【比較例1~4】表1に示す溶液濃度のものを使う以外は、実施例1~5と同様な製造法によって高密度細胞アレイ基板を得た。その後、同様な操作で細胞を播種し、親水性高分子被覆領域のみに培地を残すことを試みた。得られた基板の被覆量を表2に示す。親水性高分子の被覆量が少ないと培地を保持させることは困難であった。また、多すぎると含水した高分子層の凹凸が顕著になり、顕微鏡下での観察の際、視野が悪くなり、基材として適当なものではなかった。強疎水性高分子の被覆量が少ないと培地をはじかせることは困難であった。また、多すぎると高分子層の凹凸が顕著になり、顕微鏡下での観察の際、視野が悪くなり、基材として適当なものではなかった。

【0020】

【表1】

溶液濃度

	N-イソプロピルアクリルアミド	アクリルアミド	ポリジメチルシロキサン
実施例1	30wt%	20wt%	30wt%
実施例2	30wt%	30wt%	20wt%
実施例3	40wt%	20wt%	30wt%
実施例4	40wt%	30wt%	20wt%
実施例5	50wt%	20wt%	20wt%
比較例1	30wt%	1wt%	20wt%
比較例2	30wt%	60wt%	20wt%
比較例3	30wt%	20wt%	1wt%
比較例4	30wt%	20wt%	55wt%

【0021】

【表2】

被覆量

	ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド	ポリアクリルアミド	ポリジメチルシロキサン
実施例1	$1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$
実施例2	$1.6 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$2.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$0.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$
実施例3	$1.8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$1.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$1.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$
実施例4	$1.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$2.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$0.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$
実施例5	$2.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$1.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$0.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$
比較例1	$1.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$1.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$
比較例2	$1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$21.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$0.9 \mu\text{g}/\text{cm}^2$
比較例3	$1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$0.05 \mu\text{g}/\text{cm}^2$
比較例4	$1.4 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$1.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$	$25.0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$

【0022】

【実施例6】細胞付着性高分子被覆領域を作成するため、20wt%1,2-ナフトキノンジアド-4-スルホン酸を側鎖に有するフェノール樹脂のジオキサン溶

液を用いる以外、実施例1と同様な製造法によって高密度細胞アレイ基板を得た。得られた基板上の上記ポリマーの被覆量は $1.1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であった。その後、同様な操作で細胞を播種し、ジクロルベンゼンによるアッ

セイを行った。細胞の剥離、回収は各親水性高分子被覆領域毎に5分間、UV光を照射することで行えた。この方法によれば、光を各親水性高分子被覆領域毎に集められ、1ヶ所の親水性高分子被覆領域内にある細胞を選択的に剥離、回収できることを確認することができた。

【0023】

【発明の効果】本発明の高密度細胞アレイ基板、及びそれを利用したアッセイ系により、使用する薬剤（例えば、抗ガン剤）の種類、使用濃度の最適化をおこなうことで、薬剤の副作用を大きく減少させると共に、疾患の薬物治療成績を大きく向上させることが可能である。このことは、患者の予後を向上させ、また再発率を下げることで、医療経済にも大きく貢献すること期待される。また、本技術は、医薬品開発や環境アセスメント、基礎

生命科学研究にも利用でき、極めて有効な技術である。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の高密度細胞アレイ基板の一例を示す図である。

【図2】本発明の高密度細胞アレイ基板を製造する一方を示す工程図である。

【図3】(a)は高密度細胞アレイ基板に細胞と培地を配置した一部を示す図である。(b)は本発明の高密度細胞アレイ基板の一例を示す図である。

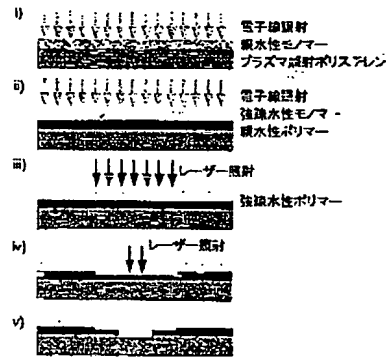
【図4】本発明のインクジェットプリンターを用いた多検体細胞のアッセイ方法を説明する図である。

【図5】本発明の高密度細胞アレイ基板表面上に配列した肝細胞の図である。

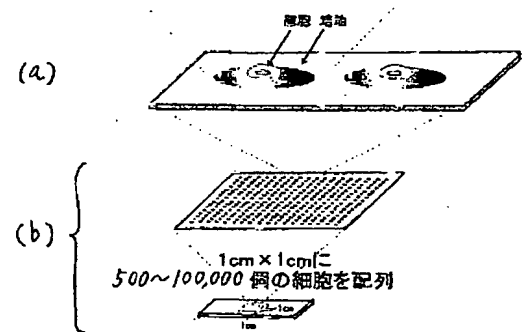
【図1】



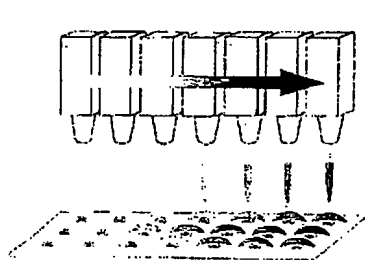
【図2】



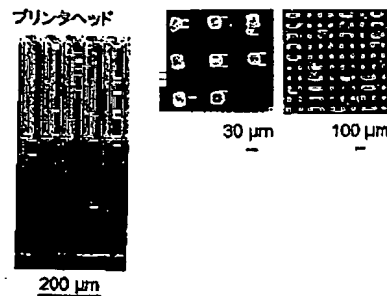
【図3】



【図4】



【図5】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁷

C 1 2 M 1/34

C 1 2 N 1/00

15/09

C 1 2 Q 1/02

G 0 1 N 33/15

33/50

識別記号

Z N A

F I

C 1 2 M 1/34

C 1 2 N 1/00

C 1 2 Q 1/02

G 0 1 N 33/15

33/50

33/53

(参考)

D 4 B 0 6 5

A 4 C 0 8 4

Z

Z

M

33/53

33/566

37/00

1 0 2

33/566

37/00

C 1 2 N 15/00

1 0 2

Z N A A

F ターム(参考) 2G045 AA40 BA11 BB50 DA12 DA13

DA14 DA36 FB02

4B024 AA11 BA80 GA11 GA16 HA11

4B029 AA02 AA07 AA23 BB01 CC08

DG01 DG06 DG08 FA04 FA12

4B033 NA11 NB02 NB36 NB67 NC06

NC12 NC16 ND08 ND12 ND20

4B063 QA01 QA05 QA19 QA20 QQ20

QQ61 QQ91 QR74 QR82 QS22

QS24 QS28 QS40 QX01

4B065 AA90X AC20 BC41 BC48

4C084 AA17 NA20 ZB26

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.